

MARBURG

1967

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. rer. nat. P. Karlson

THESIS

Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Hormonen

Über den Einfluß von Steroidhormonen auf den
Ribonucleinsäure - Stoffwechsel isolierter Zellkerne

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Wolfgang | Schmid

aus Marburg

Marburg (Lahn) 1967

Untersuchungen über den Wirkungsmechanismus von Hormonen

Über den Einfluß von Steroidhormonen auf den
Ribonucleinsäure - Stoffwechsel isolierter Zellkerne

INAUGURAL - DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der Hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps - Universität zu Marburg

vorgelegt von

Wolfgang Schmid

aus Marburg

Marburg (Lahn) 1967

Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am: 29. 8. 1967

Gedruckt mit Genehmigung der Fakultät.

Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Heuser

Referent: Prof. Dr. P. Karlson

Correferent: Prof. Dr. R. Buchholz

Inhaltsverzeichnis

Seite

A. Einleitung	1
B. Material und Methoden	7
C. Ergebnisse	20
1. Progesteron - Endometriumzellkerne	20
2. Ecdyson - Epidermiszellkerne	24
3. Cortisol - Leberzellkerne	27
D. Diskussion	37
E. Zusammenfassung	42
F. Literaturverzeichnis	44

Es ist seit langem bekannt, daß Hormone regulierend in die Entwicklung und ganz allgemein in den Stoffwechsel eines Lebewesens eingreifen. Hormone sind chemisch definierbare Stoffe, ihre spezifische Wirkung entfalten sie, indem sie biochemische Reaktionsabläufe in bestimmte Richtung lenken. Damit erhebt sich die Frage nach dem Wirkungsmechanismus: Welche Reaktionen werden beeinflusst, und in welcher Weise?

Hierzu wurden bisher verschiedene Hypothesen aufgestellt, entsprechend den jeweils erreichten Kenntnissen in den Grundwissenschaften der Biochemie, der physikalischen Chemie, der molekularen Biologie. Eine schon früh aufgestellte Theorie nimmt als primären Ort der Hormonwirkung die Zellmembran an^(20, 20a, 20b). Diese Theorie wird auch heute noch viel diskutiert, besonders im Zusammenhang mit dem Wirkungsmechanismus des Insulins, des Parathormons⁽⁴⁷⁾ und des Adiuretins^(45, 45a, 46).

Eine andere Theorie^(36, 59) nimmt eine direkte Wirkung von Hormonen auf die Aktivität von Enzymen an. Danach soll das Hormon als Coenzym zusammen mit einem Protein^(20, 20a, 20b), dem Apoenzym, den wirksamen Enzymkomplex bilden, wie es viele Vitamine tun, oder es soll durch seine Anlagerung die Proteinstruktur verändern^(10, 20, 20a, 20b). Eine solche Strukturänderung wurde "allosterischer Effekt" genannt⁽³⁷⁾. Ein solcher Effekt ist für Steroidhormone bei der Glutamatdehydrogenase⁽⁵⁷⁾ nachgewiesen worden, er ist aber nicht spezifisch,

es zeigen ihn auch Steroide ohne Hormonwirkung.

Eine dritte Theorie geht vom Mechanismus der Proteinbiosynthese aus. Vor fünf Jahren stellten Jacob und Monod eine neue Theorie über die genetische Steuerung der Proteinbiosynthese bei Bakterien auf⁽⁸⁾. Es wird angenommen, daß dieses Modell für alle Lebewesen Gültigkeit besitzt, obwohl es durchaus möglich ist, daß bei höheren Organismen diese Steuerung etwas anders verläuft.

Die Information für die Proteinstruktur ist in dem genetischen Material, in der Desoxyribonucleinsäure (DNA) gespeichert. Normalerweise wird aber nicht die ganze Information von der Zelle genutzt, sondern nur ein kleiner Teil. Auf dem Niveau der Proteine ausgedrückt heißt das, daß die Zelle nur einen kleinen Teil der Proteine synthetisiert, zu deren Bildung sie die Information in sich trägt. Bei Eukaryoten wird die Information aus dem Zellkern, wo das genetische Material lokalisiert ist, durch eine spezielle Art von Ribonucleinsäure (RNA) an den Ort der Proteinsynthese, die Ribosomen, überbracht. Die Synthese dieser RNA, von Jacob und Monod "messenger"-RNA genannt, liegt im Zellkern, sie wird von einem besonderen Enzym, der RNA-Polymerase, gebildet, die einen festen Komplex mit der DNA bildet; ohne DNA kann keine RNA gebildet werden. Es findet eine Übersetzung der Information der DNA in die RNA statt, die RNA dient wiederum als Matrize für das zu bildende Protein.

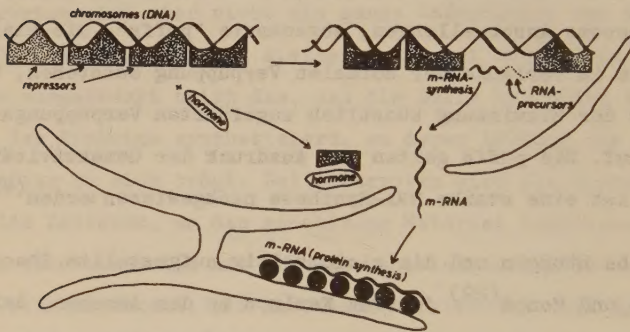
Der Fluß der Information vom genetischen Material zu den Ribosomen ist steuerbar, er kann an- und abgeschaltet werden. So

vermögen bei Bakterien manche Substrate die Neubildung "ihres" Enzyms zu induzieren, des Enzyms, das ihre Weiterverarbeitung im Stoffwechsel ermöglicht. Jacob und Monod nehmen an, daß ein Teil der DNA normalerweise durch sogenannte Repressoren blockiert ist, und daß diese Blockierung durch bestimmte Stoffe aufgehoben werden kann, so daß die in der DNA gespeicherte Information für die Zelle verwertbar wird.

Bei den Versuchen mit Ecdyson, dem Häutungs- und Verpuppungshormon der Insekten, fanden Clever und Karlson⁽⁸⁾, daß das Hormon morphologische Veränderungen an den Riesenchromosomen von Dipteren verursacht. Es entstehen an bestimmten Stellen des Chromosoms Anschwellungen, sogenannte "puffs". Die gleichen puffs, die im Verlaufe der normalen Verpuppung entstehen, treten unter der Einwirkung künstlich zugeführten Verpuppungshormons auf. Die puffs gelten aus Ausdruck der Genaktivität, an ihnen ist eine starke RNA-Synthese nachgewiesen worden⁽⁴²⁾.

Diese Beobachtungen und die gleichzeitig aufgestellte Theorie von Jacob und Monod⁽²²⁾ führten Karlson zu der Annahme, daß Hormone durch Aktivierung von Genen wirkten. Später präzierte er seine Theorie dahingehend, daß Hormone über ^(23, 23a, 23b)Genaktivierung als Enzyminduktoren wirken. Der Ablauf der Hormonwirkung sieht nach dieser Vorstellung folgendermaßen aus: Das Hormon bewirkt eine Derepression der DNA und gibt so die in der DNA gespeicherte Information frei. Der Vorgang der Derepression ist noch weitgehend ungeklärt, es wird ein allosterischer Effekt des Hormons auf den noch nicht identifizierten Repressor diskutiert. Als nächsten Schritt macht die

RNA-Polymerase eine Abschrift der freigegebenen DNA in der Sprache der RNA, es erfolgt die messenger-RNA-Synthese. Die messenger-RNA wird auf noch unbekannte Weise aus dem Kern ausgeschleußt und gelangt zu den Ribosomen, wo die Protein-synthese erfolgt, indem die Ribosomen den messenger-Codon ablesen, der die Reihenfolge der Aminosäuren beinhaltet. Das neugebildete Protein greift dann im Falle des Enzym-proteins wiederum regulierend in den Zellstoffwechsel ein.



Diese Theorie ist für eine Reihe von Hormonen gut belegt. So führt die Applikation von Ecdyson bei Larven der Schmeißfliege *Calliphora erythrocephala* zu einer Steigerung des RNA-Stoffwechsels und zur Neubildung eines zur Verpuppung notwendigen Enzyms, der^(25, 52) DOPA-Decarboxylase⁽²⁴⁾. Auch das Auftreten von messenger-RNA, die die Information für dieses Enzym enthält, ist nachgewiesen worden⁽⁵⁰⁾.

Cortisol vermag eine Reihe von Leberenzymen zu induzieren, so die Tyrosin-Ketoglutarat-Transaminase^(14, 26), die Tryptophanpyrrolase^(14, 28), die Pyruvat-Glutamat-Transaminase⁽⁴⁸⁾, die Glycogensynthetase⁽²¹⁾ und andere. Für die ersten drei ist die Neusynthese direkt nachgewiesen worden, für die anderen indirekt dadurch, daß sich ihre Induktion durch Hemmstoffe der Proteinsynthese wie Actinomycin D, Puromycin und andere unterdrücken ließ. Eine Steigerung des RNA-Stoffwechsels^(13, 27, 51) und die Synthese einer messenger-RNA für die Tyrosin-Transaminase⁽⁵³⁾ ist ebenso beschrieben worden wie eine Aktivitätssteigerung der RNA-Polymerase, des Enzyms, das die RNA in Abhängigkeit von der DNA synthetisiert^(2, 31).

Für eine Reihe weiterer Hormone ist ein Einfluß auf die RNA-Synthese nachgewiesen worden, so für die Oestrogene am Uterus^(18, 19, 19a, 22, 38, 49, 34), für das Testosteron an der Samenblase und der Prostata^(23, 29, 29a, 32), für Aldosteron an der Niere^(6, 12, 43), für Thyroxin in der Leber⁽⁵⁶⁾, für Erythropoietin am Knochenmark⁽¹⁷⁾ und für die Hypophysenvorderlappenhormone an den Organen, die ihrer Steuerung unter-

liegen (1, 4, 15, 27, 30, 41, 44, 55). Die folgende Tabelle gibt eine Übersicht davon.

Tabelle 1

Nachgewiesene Hormonwirkungen auf Erfolgsorgane.

Hormon	Organ	Steigerung der RNA- Synthese	RNA- Polyme- rase	Enzym- induktion	Literatur
Ecdyson	Calli- phora- epider- mis	+		+	24, 25, 52
Corti- sol	Leber	+	+	+	2, 13, 14, 21, 26, 27, 28, 31, 48, 51, 53
Oestro- gene	Uterus	+	+		18, 19, 19a, 34, 38, 49
Gesta- gen	Uterus			+	3, 36
Testo- steron	Samen- blase u. Prostata	+	+		29, 29a, 32
Aldo- steron	Niere	+			6, 12, 43
Thyroxin	Leber	+	+	+	56
Erythro- poietin	Knochen- mark	+			17
FSH	Ovar			+	1, 4
STH	Leber	+	+		30, 41, 44

In den meisten bisherigen Untersuchungen ist das Hormon in vivo verabfolgt worden. Da die Hormonwirkung erst nach einiger Zeit sichtbar wird, ist es auf diese Weise unmöglich oder fast unmöglich, sicher den primären Angriffspunkt der Hormone festzulegen; man weiß nie genau, ob eine beobachtete Wirkung eine primäre Hormonwirkung ist, oder ob sie mit der primären Hormonwirkung durch eine mehr oder weniger lange Reaktionskette verbunden ist. Nach den Vorstellungen von Karlson ist der Zellkern der primäre Ort der Hormonwirkung. Sekeris und Dukas haben gezeigt, daß isolierte Rattenleberkerne noch RNA synthetisieren können, und daß sie auf Zugabe von Cortisol mit einer erhöhten Synthese antworten⁽¹¹⁾.

In dieser Arbeit soll gezeigt werden, daß isolierte Kernsysteme verschiedener Herkunft durch Hormon stimuliert werden; außerdem soll gezeigt werden, daß die synthetisierte RNA messenger-Eigenschaften besitzt, und daß die Hormoneffekte spezifisch sind.

Material und Methoden:

Von den Hormonen waren Cortisol und die anderen Steroide Gaben der Firma Schering, Triton X-100 eine Gabe der Firma Rohm und Haas.

Die ¹⁴C-markierten Substanzen stammten von Amersham Radiochemical Corp., die inaktiven Aminosäuren von California Corp. for Biochem. Research, Kreatinphosphat und Kreatinkinase von der Firma Boehringer, alle anderen Reagenzien von Merck.

Die Ratten (Stamm Wistar BR II) wurden von der Tierzüchterei Brünger bezogen. Es wurden nur männliche Tiere, die 100-200 g

schwer waren, verwendet.

Die Calliphoralarven (7 Tage alt) stammten aus der Zucht des Instituts.

Die Schweineuteri wurden auf dem Schlachthof Marburg gesammelt. Es wurden nur Uteri in der Proliferationsphase genommen; bis zum Beginn der Präparation der Zellkerne wurden sie in Eis aufbewahrt, aber nicht länger als eineinhalb Stunden.

Verwendete Lösungen:

A: 0,05 M Tris/HCl pH 7,5 + 0,025 M KCl + 0,01 M $MgCl_2$ + 0,25 M Saccharose.

B: Wie Medium A, jedoch 0,001 M $MgCl_2$.

C: 0,03 M Na-Phosphatpuffer pH 6,8 + 0,14 M NaCl + 0,3 % Na-Desoxycholat.

Präparation der Zellkerne: (modifiziert nach⁽⁴⁰⁾)

a) Rattenleberkerne

Die Ratten wurden durch Genickschlag getötet, die Leber in vitro mit eiskaltem Medium A durchspült, mit der Schere zerkleinert, auf Eis gelagert und in einem Homogenisator nach Potter-Elvehjem homogenisiert.

b) Calliphora-Epidermiszellkerne

Die Calliphoralarven wurden sorgfältig gewaschen, getrocknet, zwischen Filterpapier verteilt und sorgsam ausgepreßt, bis die Cuticeln von dem Fettkörper und den inneren Organen befreit waren. Die Cuticeln mit der anhaftenden Epidermiszellschicht wurden gesammelt, mehrmals mit kaltem Medium A gewaschen, um

die Hämolymphe und noch anhaftende Fettkörperreste zu entfernen. Die Cuticeln wurden mit einem Ultraturrax zerkleinert und mit einem Potter-Elvehjem-Homogenisator aus V2A-Stahl homogenisiert.

c) Schweineuteri

Die Schweineuteri wurden nach dem Aussehen der Ovarien und der Konsistenz und Farbe der Uterusmuskulatur danach beurteilt, in welcher Phase sie waren. Es wurden nur Uteri in der Proliferationsphase genommen. Die Uteri wurden aufgeschnitten, das Endometrium mit Objektträgern abgekratzt, in Medium A aufgenommen und in einem Potter-Elvehjem-Homogenisator homogenisiert.

Die Homogenate wurden in allen Fällen in der gleichen Weise weiterverarbeitet. Sie wurden zuerst durch eine und dann durch sechs Schichten Mull filtriert, um größere Gefäße, Muskelteile, Bindegewebsstränge oder Cuticelstücke zu entfernen. Es folgte eine Zentrifugation bei 1200 x g. Bei dem Leberhomogenat wurde der Überstand zur Präparation der Ribosomen verwendet, sonst wurde der Überstand verworfen. Das Sediment wurde in Medium B suspendiert, bei 600 x g abzentrifugiert, wieder in Medium B, das 0,5 % Triton X-100 enthielt, resuspendiert und sofort abzentrifugiert. Alle Zentrifugationen dauerten 7 min. Das Sediment aus der letzten Zentrifugation stellte die fertige Kernpräparation dar, es wurde zur Inkubation in Medium B fein verteilt. Die ganze Kernpräparation dauerte ca. 1 bis 1 1/2 Stunden.

Teilweise wurden die Kerne auch 5 mal abzentrifugiert. In einem Teil der Inkubationen wurden die Kerne 5 min bei Zimmertemperatur mit 0,5 % Triton X-100 inkubiert und das Triton X-100, um die Reaktion zu stoppen, mit kaltem Medium B verdünnt und dann abzentrifugiert. Diese Modifikationen hatten keinen Einfluß auf die Qualität und Reinheit der Kernpräparation; wir wählten daher diejenige, die am kürzesten dauerte und die ganz im Kälteraum bei 4° C ausgeführt wurde, als Standardpräparation.

Einen wesentlichen Reinigungsschritt stellt bei dieser Präparation die Behandlung mit dem Detergens Triton X-100 dar, das einen großen Teil von RNA und Protein in Lösung bringt. Wahrscheinlich greift es die Membranen des endoplasmatischen Reticulums und die Kernmembran an, indem es Lipide emulgiert; die an die Lipidmembranen gebundenen Protein- und RNA-Partikel werden durch niedrige g-Zahl bei der Kernpräparation nicht abzentrifugiert.

Von den Kernpräparationen wurden routinemäßig Ausstrichpräparate gemacht, die mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt wurden, oder die Präparation wurde im Phasenkontrastmikroskop beurteilt. Die Präparationen waren frei von Mitochondrien, die Kerne waren mehr oder weniger zusammengeklumpt, und es fand sich in wechselndem Umfang ein basophiler Hintergrund, der dem Anschein von geplatzten Zellkernen herrührte. Bei den Calliphorapräparationen fanden sich wechselnde Mengen Cuticulafragmente und Tracheenreste, die Kerne waren außerordentlich verschieden groß, man fand neben einer großen Anzahl

kleiner Kerne auch immer Kerne, deren Durchmesser ca. 2 bis 3 mal so groß war.

Weitere Reinheitskriterien siehe später.

Inkubation:

Die Inkubation erfolgte in einem Wasserbad bei 37° C unter ständigem Schütteln in verschlossenen Reagenzgläsern. Zu einem Ansatz wurden 2 ml Kernsuspension verwendet; die Steroide wurden in Äthanol gelöst hinzugegeben, die Kontrollen erhielten eine entsprechende Menge Äthanol.

Extraktion der RNA⁽¹⁶⁾:

Nach der Inkubation wurden die Ansätze sofort mit 4 ml Medium C versetzt und so schnell wie möglich 6 ml 80 %iges Phenol hinzugegeben. Die RNA wurde durch Schütteln dieses Gemisches extrahiert. Die Extraktion erfolgte entweder in einem Schritt bei 65° C (Extraktion der gesamten RNA) oder fraktioniert zunächst 4°C bzw. 50°C und durch eine zweite Extraktion bei 65°C.

Im einzelnen ging die Extraktion auf folgende Weise vor sich: Das Gemisch von Kernsuspension, Medium C und Phenol wurde 20 min geschüttelt und dann 20 min bei 7000 x g zentrifugiert. Die RNA befindet sich dann in der wässrigen Phase. Diese Phase wurde mit 5 ml 80 %igem Phenol versetzt, nochmals 20 min bei Zimmertemperatur geschüttelt und die wässrige Phase von dem Phenol durch Zentrifugation wie oben getrennt.

Erfolgte die Extraktion der RNA fraktioniert bei verschiedenen Temperaturen, so erfolgte die erste Extraktion zunächst bei niedriger Temperatur (4°C bzw. 50°C). Wässrige- und Phenolphase wurden getrennt, die wässrige Phase quantitativ abgehoben und nochmals mit Phenol gewaschen. Zu der Phenolphase und einer bei der Zentrifugation sich bildenden Zwischenschicht wurden 5 ml Medium C hinzugegeben und unter Schütteln erneut bei 65°C extrahiert. Die Phasen wurden wieder durch eine 20 minütige Zentrifugation bei $7000 \times g$ getrennt, und die wässrige Phase nochmals wie oben mit Phenol gewaschen.

Die mit Phenol gewaschene wässrige Schicht wurde abgehoben und das gelöste Phenol durch fünfmaliges Ausschütteln mit Äther entfernt. Die RNA wurde aus der wässrigen Phase durch Zugabe von zwei vol. Äthanol zu einem vol. wässrige Phase und 1 mg NaCl/ ml wässrige Phase bei -15°C ausgefällt. Die Fällung erfolgte über Nacht. Der Niederschlag wurde durch 20 minütige Zentrifugation bei $9000 \times g$ gesammelt und durch Evakuieren vom restlichen Wasser, Äthanol und Äther befreit. Die RNA wurde dann in einem kleinen Volumen H_2O gelöst, die nicht-gelösten Salze wurden abzentrifugiert. Der RNA-Gehalt der Lösung wurde durch Messung der UV-Absorption bei 260 mp bestimmt.

Schema der RNA-Präparation:

2 ml Kernsuspension + 4 ml Desoxycholatpuffer pH 6,8 + 6 ml
Phenol (80 %)

Unter Schütteln Inkubieren während 20 min bei

65° C

4° C bzw. 50° C

20 min Zentrifugieren bei 7000 x g

Wässrige Phase + 5 ml Phenol

Zwischenschicht mit Phenol-
phase + 5 ml Desoxycholat-
puffer

20 min Schütteln bei
Zimmertemperatur

20 min Inkubieren unter Schüt-
teln bei 65° C

20 min Zentrifugieren bei 7000 x g

Wässrige Phase + 5 ml Phenol

20 min Schütteln bei Zimmer-
temperatur

20 min Zentrifugieren bei 7000 x g

Wässrige Phase abheben

Wässrige Phase abheben

Pro ml wässrige Phase 1 mg NaCl + 2 ml Äthanol hinzugeben

Über Nacht Fällern bei -15° C, Abzentrifugieren der ausge-
fällten RNA, in einem kleinen Volumen H₂O (ca. 0,5 ml) lösen,
nicht gelöste Salze abzentrifugieren, RNA durch UV-Absorption
quantitieren.

Messung der RNA-Synthese:

Die Kerne wurden mit 0,5 μC $2\text{-}^{14}\text{C}$ -Uracil (5,6 μg in wässriger Lösung) inkubiert und wie oben beschrieben präpariert und quantitiert. Die in Wasser gelöste RNA wurde auf Filterpapier aufgetragen, und die Papierchen zur Fällung der RNA in eiskalte 5 %ige Perchlorsäure geworfen. Die Papierchen wurden 20 min in der Kälte stehengelassen, mit frischer Perchlorsäure, um das nicht eingebaute radioaktive Uracil zu entfernen, und dann 2 mal mit Äthanol/Äther (1:1) und 1 mal mit Äther gewaschen, um das Wasser und die Perchlorsäure zu entfernen. Nach dem Trocknen kamen die Plättchen auf den Boden von Zählgläsern, die 10 ml Szintillationsflüssigkeit (5 g PPO, 0,1 g POPOP in 1 l Toluol gelöst) enthielten. Die Messung der Radioaktivität erfolgte in einem Packard- oder Nuclear Chicago-Flüssigkeitsszintillationszähler.

Messung der Proteinsynthese stimulierender Aktivität der RNA:

a) Präparation der Ribosomen

Der bei der Präparation anfallende erste Überstand, der alle subcellulären Partikel außer den Kernen und das Cytoplasma enthält, wurde 20 min bei 25000 x g in einer Spinco L - Zentrifuge zentrifugiert, um die Mitochondrien zu entfernen. Zu 0,9 ml des Überstandes wurden dann 0,1 ml Glycyl-Glycine-Puffer pH 8,0, der 2,5 % Na-Desoxycholat enthielt, zugegeben und 90 min bei 105000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Sediment in einem engen Homogenisator nach

Potter-Elvehjrn sorgfältig homogenisiert und nochmals 90 min bei 105000 x g zentrifugiert. Zur Proteinsynthese wurden die Ribosomen in Medium A suspendiert.

b) Präparation des 105000 x g - Überstandes:

Als Ausgangsmaterial diente wieder der bei der Kernpräparation anfallende erste Überstand. Er wurde wie die Ribosomenpräparation 20 min bei 25000 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde dann nochmals 90 min bei 105000 x g zentrifugiert, die oben schwimmende Lipoidschicht abgehoben und nur der klare Überstand verwendet.

c) Zusammensetzung des Aminosäuren einbauenden Systems

Das in vitro Aminosäuren einbauende System (ASES) bestand aus 0,25 mol ATP, $7,5 \times 10^{-3}$ mol GTP, 2,5 mol Kreatinphosphat, 5 g Kreatinkinase und außerdem aus 0,25 mol folgender Aminosäuren: Alanin, Arginin, Cystin, Glutaminsäure, Glycin, Histidin, Isoleucin, Lysin, Methionin, Phenylalanin, Prolin, Serin, Threonin, Tyrosin, Valin. ^{14}C -Leucin wurde in einer Menge von 0,1 μC zugesetzt. Alle Substanzen waren in Medium A gelöst. Weiter kamen hinzu: 0,15 ml Medium A, 0,1 ml Ribosomensuspension, 0,05 ml des 105000 x g - Überstandes und 0,05 ml der zu testenden RNA, entsprechend 10-20 μg RNA.

d) Messung der Proteinsynthese

Die Reaktion wurde durch Zugabe des Aminosäurengemisches gestartet. Die Inkubationstemperatur betrug 37°C , inkubiert wurde in kleinen Erlenmeyer-Kölbchen, die mit Parafilm ver-

schlossen wurden.

Zu Versuchsbeginn und zu verschiedenen Zeiten wurden je 0,1 ml des Ansatzes auf Filterpapier (Schleicher & Schüll Nr. 2043 b) aufgetragen, und die Papierchen in eiskalte 5 %ige Trichlor-essigsäure (TCA) geworfen. Nach 20 min wurde die TCA erneuert und die Plättchen 20 min in der Säure gekocht, um die unspezifisch adsorbierten Aminosäuren zu entfernen. Die Plättchen wurden dann nochmals 5 min bei Zimmertemperatur mit frischer TCA gewaschen und die Säure durch zweimaliges Waschen mit Äthanol/Äther (1:1) und einmaliges Waschen mit Äther entfernt. Nach dem Trocknen wurden die Plättchen auf den Boden von Zählgläsern, die 10 ml Szintillationsflüssigkeit (Zusammensetzung siehe oben) enthielten, gelegt. Die Messung des eingebauten Leucins erfolgte in einem Packard- oder Nuclear Chicago-Szintillationszähler.

Auf dieselbe Weise wie der Leucineinbau wurde auch der Einbau von 2-¹⁴C-Uracil in die Kern-RNA gemessen. Die Szintillationsflüssigkeit und die Gläsern konnten mehrmals hintereinander gebraucht werden, da keine Radioaktivität in Lösung ging, ein Hinweis dafür, daß die radioaktiven Vorstufen tatsächlich in RNA bzw. Protein eingebaut wurden; die Vorstufen gehen in geringem Umfang in Lösung.

Messung der Tyrosin- -Ketoglutarat-Transaminase:

Der Ansatz zur Proteinsynthese war derselbe wie unter ASES beschrieben. Nur war das markierte Leucin durch unmarkiertes

ersetzt. Nach 40 min Inkubation zur Proteinsynthese wurden die Kölbchen aus dem Inkubator genommen und in Eis gestellt, um die Proteinsynthese zu stoppen. Zur Messung der Tyrosintransaminaseaktivität wurden zu jedem Ansatz 0,34 mol/ml Ketoglutarat, 0,38 mol/ml Pyridoxalphosphat und 0,2 μC ^{14}C -Tyrosin zugegeben. Die Menge des zugesetzten Tyrosins betrug 56 μmol /Ansatz. Der Ansatz wurde dann 20 min bei 37° C inkubiert, und die Reaktion durch kurzes Erhitzen in kochendem Wasser gestoppt. Die ausgefallenen Proteine wurden abzentrifugiert, und der Überstand über Nacht in n-Butanol - Essigsäure - Wasser 4 : 1 : 5 auf Schleicher & Schüll-Papier Nr. 2043 b aufsteigend chromatographiert. Die Streifen wurden in Stücke geschnitten und die Radioaktivität der einzelnen Stücke im Flüssigkeitsszintillationszähler gemessen. Als Maß für die Transaminaseaktivität diente die Radioaktivität bei R_f 75 (R_f -Wert der p-Hydroxyphenylbrenztraubensäure).

Basenanalyse der RNA:

Die mit 2- ^{14}C -Uracil markierte RNA wurde nach der Messung des Einbaus mit 0,3 N KOH aus den Plättchen extrahiert und 18-20 Stunden bei 37° C hydrolysiert. Dann wurde mit 70 %iger Perchlorsäure neutralisiert und die Lösung im Rotationsverdampfer auf kleinstes Volumen eingeeengt, die ausgefallenen Salze wurden durch Zentrifugieren entfernt. Die Basen wurden durch aufsteigende Papierchromatographie in Butanol - Essigsäure - Wasser 12 : 3 : 5 getrennt, das Papier nach der Entwicklung in Streifen

geschnitten und die Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler gezählt. Die Identifizierung der Radioaktivität erfolgte durch den Vergleich der R_f -Werte gleichzeitig mitlaufender bekannter Nucleotide.

Auf dieselbe Art wurde die Umwandlung des 2- ^{14}C -Uracils in UTP verfolgt. Als Ausgangsmaterial diente der Äthanol - Wasser - Überstand, der nach der Fällung der RNA übrigblieb. Der Überstand wurde im Rotationsverdampfer eingengt, in Butanol - Essigsäure - Wasser 12 : 3 : 5 chromatographiert und die Radioaktivität gemessen. Die Identifizierung erfolgte wiederum durch den Vergleich mit bekannten Substanzen.

Dichtegradienten-Zentrifugation der RNA:

Der Gradient wurde aus 5 %iger und 20 %iger Saccharoselösung hergestellt. Die RNA wurde in Wasser gelöst, auf den Gradienten (5 ml) aufgetragen und in einem SW 39-Rotor 8 Stunden bei 115000 x g zentrifugiert. Der Boden der Röhrchen wurde vorsichtig mit einer dünnen Kanüle durchbohrt und die Fraktionen gesammelt. Die Messung der RNA erfolgte durch die Messung der UV-Absorption, die Messung der Radioaktivität im Flüssigkeitsszintillationszähler.

Proteinbestimmung:

Mit alkalischem Kupfersulfat und Folin's Reagens nach Lowry⁽³⁴⁾.

RNA-Bestimmung:

Die mit Phenol extrahierte und mit Äthanol und NaCl-Zusatz gefällte RNA wurde in Wasser gelöst und die Konzentration durch Messung der Absorption im UV bei 260 m μ gemessen. Eine Extinktion von 1,0 wurde als 30 μ g/ml angenommen.

Zur Bestimmung des RNA-Gehaltes der Ribosomen wurde die RNA mit 5 %iger Perchlorsäure extrahiert, und die Menge der RNA mit der Orcin-Methode bestimmt⁽³⁹⁾.

Bestimmung der mit Phenol extrahierten RNA mittels der UV-Absorption und der Orcin-Methode ergab übereinstimmende Werte.

DNA-Bestimmung:

Nach Ceriotti durch Kochen der Probe mit Indol und HCl; der sich dabei bildende unspezifische Farbstoff wurde durch Ausschütteln mit Chloroform entfernt, der DNA-Gehalt kolorimetrisch bestimmt.

Ergebnisse der Routineanalysen:

a) Reinheit der Kernpräparation

Der DNA/RNA-Quotient des Ausgangshomogenats betrug ca. 7, der der Kernpräparation 0,2-0,3.

b) Reinheit der mit Phenol extrahierten RNA

Der Quotient der UV-Absorption bei 280 m μ und 260 m μ (280/260) betrug 0,45-0,50, DNA war nur in Spuren nachweisbar, der Proteingehalt nach der Lowry-Methode betrug wenige Prozent.

c) Der RNA-Quotient der Ribosomen war 0,25.

Ergebnisse:

Wirkung von Progesteron auf Endometriumzellkerne:

Schon früher ist von verschiedenen Autoren gezeigt worden, daß eine der frühesten Wirkungen von Oestrogenen auf den Uterus eine Steigerung des RNA-Stoffwechsels ist^(18, 19, 19a, 38, 49, 34).

Wir versuchten, diesen Effekt auch an isolierten Zellkernen nachzuweisen, wie es Sekeris und Dukas⁽¹¹⁾ für das Cortisol an isolierten Rattenleberkernen getan hatten. Als günstiges Ausgangsmaterial für die Zellkerngewinnung, das in genügender Menge zu beschaffen war, erwiesen sich Schweineuteri. Schweine sind auch aus folgendem Grund ein günstiges Versuchsmaterial, sie besitzen wie der Mensch einen biphasischen fortlaufenden Zyklus, anders als Ratten, die nur eine Oestrogenphase haben.

Wir inkubierten zunächst die Zellkerne mit Oestradiol in der Dosierung von 0,1-10 µg/ml, daher dabei aber nie einen Hormoneffekt.

Einfluß von Oestradiol auf den ¹⁴C-Uracil-Einbau in RNA

Extraktions- temperatur	Kontrolle Ipm/mg RNA	Oestradiol 0,1 µg Ipm/mg RNA	1 µg	10 µg
4° C	6390		5500	
65° C	18700		18000	
4° C	5210	5025	6025	5100
65° C	33500	30950	33700	29500

Da unsere Zellkerne alle von Uteri aus der Oestrogenphase stammten, überlegten wir, ob nicht die Kerne möglicherweise schon maximal mit endogenem Oestrogen gesättigt seien, und inkubierten mit wechselnden Mengen von Progesteron. Die Ergebnisse zeigt Tabelle 2.

Tabelle 2

Einfluß von Progesteron auf den ^{14}C -Uracil-Einbau in RNA

	Kontrolle cpm/mg RNA	10 µg Prog./ml cpm/mg RNA	50 µg Prog./ml cpm/mg RNA
Experiment 1	564	766	809
Experiment 2	364	419	533

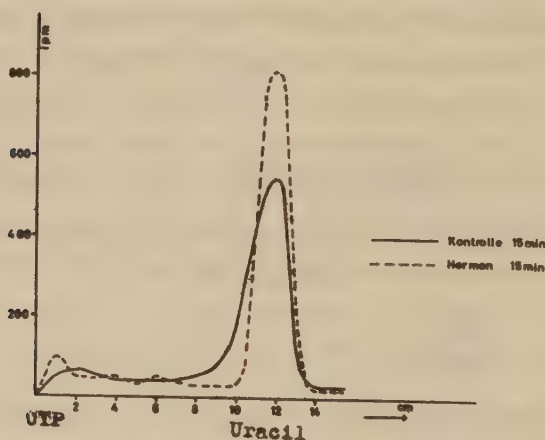
Wie ersichtlich, wird der Einbau von ^{14}C -Uracil gesteigert. Die Inkubationszeit betrug bei beiden Versuchen eine Stunde. Bei kürzerer Inkubationszeit konnten wir nie einen Unterschied zwischen hormonbehandelten und Kontrollkernen feststellen. Daß das radioaktive Uracil tatsächlich in die RNA eingebaut wird, suchten wir durch alkalische Hydrolyse der RNA und Chromatographie des Hydrolysats zu beweisen. Bei der alkalischen Hydrolyse wird die RNA in Nucleotide gespalten. Wir fanden über 90 % der Radioaktivität der RNA nach der Hydrolyse als UMP wieder, wie es zu erwarten ist, wenn das ^{14}C -Uracil in RNA eingebaut wird.

Ein möglicher Einwand gegen das Experiment ist folgender:

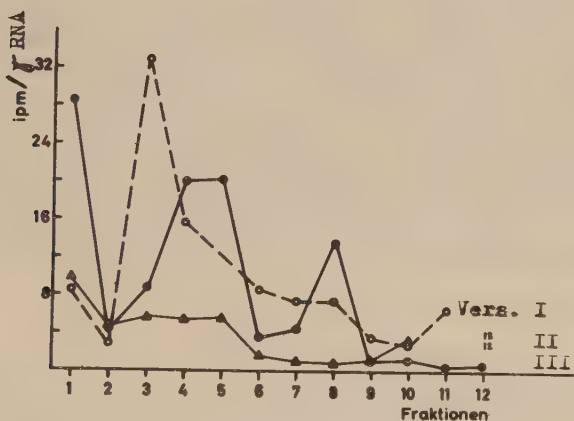
Die erhöhte spezifische Aktivität der RNA von hormonbehandelten Kernen könnte auch dadurch zustande kommen, daß das Hormon eines

der Enzyme aktiviert, die für den Aufbau von Uracil zu UTP notwendig sind. Den hormonbehandelten Kernen würde dann mehr radioaktives UTP zur Verfügung stehen, das in die RNA eingebaut würde. Man bekäme dann durch Hormonbehandlung eine RNA von höherer spezifischer Aktivität, ohne daß durch das Hormon die RNA-Synthese gesteigert wäre.

Um einen solchen Einfluß des Hormons auszuschließen, chromatographierten wir den Äthanol-Wasser-Überstand nach Fällung der RNA, in dem die löslichen Nucleotide zu finden sind. Dabei fanden wir keinen Unterschied im Aufbau von Uracil zu UTP zwischen Kontroll- und mit Hormon behandelten Kernen (Abb. 1). Damit ist sichergestellt, daß die höhere spezifische Aktivität der RNA aus hormonbehandelten Kernen auf einer gesteigerten Neusynthese von RNA beruht.



Durch Dichtegradientenzentrifugation versuchten wir, die neu-synthetisierte RNA zu charakterisieren. Unerwarteterweise fand sich ein großer Teil der Radioaktivität am Boden der Zentrifugenröhrchen, mußte also einer sehr schweren RNA angehören, einer RNA, die viel schwerer ist als normale messenger-RNA.



Diese Versuche zeigen, daß Endometriumzellkerne in der Proliferationsphase innerhalb einer Stunde auf Zufügen von Progesteron mit einer Steigerung der RNA-Synthese reagieren, Oestradiol ist dagegen nicht wirksam.

Wirkung von Ecdyson auf Epidermiszellkerne:

Ecdyson in einer Dosierung von 0,5 µg/ml vermag die RNA-Synthese in isolierten Zellkernen zu steigern. Der Effekt ist schon nach 15 min sichtbar. Der Hauptanteil der Radioaktivität wird in die 65° C - Fraktion eingebaut, die, wie noch gezeigt wird, besonders gut als Matrice für die Proteinsynthese geeignet ist, doch wird auch die 4° C - Fraktion deutlich markiert. Der durch das Hormon hervorgerufene Anstieg der spezifischen Radioaktivität ist in beiden Fraktionen etwa gleich groß.

Tabelle 3

Einfluß von Ecdyson auf den ¹⁴C-Uracil-Einbau in RNA von Epidermiszellkernen von *Calliphora erythrocephala* (cpm/mg RNA)

Vers.	RNA isoliert bei °C	Kontr. 15 min	Hormon inkubiert	% Steigerung	Kontrolle 60 min	Hormon uninkubiert	% Steigerung
1	65	1820	3310	83	7520	11720	56
2	65	1930	2870	49	3940	13960	254
3	4	1511	2420	60	5335	12995	144
	65	6740	12500	85	5840	18900	224
4	4	930	2200	136	-	-	-
	65	2990	7455	130	-	-	-

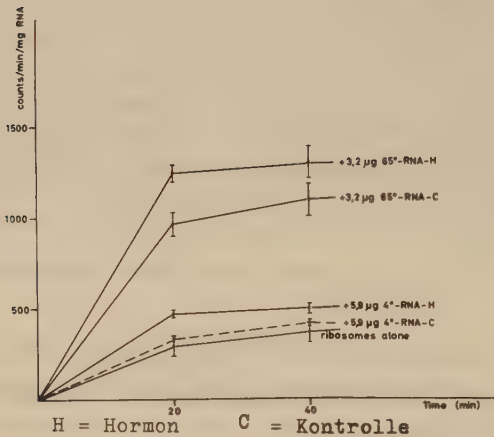
Tabelle 3 zeigt diese Verhältnisse. Der Hormoneffekt ist schon sehr früh, nach 15 min, sichtbar. Die stärkste Radioaktivität findet sich in der 65° C - Fraktion, die, wie im weiteren gezeigt wird, messenger-Eigenschaften besitzt, und in der nach Versuchen von Sekeris und Lang (50) auch den messenger für die DOPA-Decarboxylase enthält. Fettkörperkerne vermögen kaum auf zugefügtes Ecdyson zu reagieren. Für diesen Versuch wurden die Fliegenmaden mit einem feinen Spatel ausgestrichen und alles Gewebe, außer den Cuticeln, zur Kernpräparation verwendet. Die beobachtete Steigerung der RNA-Synthese könnte auch auf einer Verunreinigung durch Epidermiskerne beruhen, obwohl die Fettkörperkernpräparation außergewöhnlich sauber und homogen war. Die nächste Tabelle zeigt einen solchen Versuch.

Tabelle 4

Einfluß von 1 µg Ecdyson auf den ¹⁴C-Uracil-Einbau in RNA von Calliphoraepidermis- und Fettkörperzellkernen (Inkubationsdauer 15 min, 65° C - Fraktion)

Epidermis		Fettkörper	
	% Steigerung		% Steigerung
Kontrolle	702 Ipm	117 Ipm	
Ecdyson	1076 Ipm 54	138 Ipm	12

Beide RNA-Fractionen, die aus Epidermiskernen gewonnen wurden, haben auch Matrizenwirkung, d.h. sie steigern die Proteinsynthese in vitro. Am wirksamsten ist dabei die 65° C - Fraktion. Eine Hormonwirkung ist sowohl in der 4° C - als auch in der 65° C - Fraktion erkennbar.



Die Versuche mit Ecdyson und Calliphorazellkernen zeigen, daß die Hauptwirkung des Ecdysons in der Epidermis liegt und sich an isolierten Zellkernen schon nach 15 min nachweisen läßt. Sie zeigen weiterhin, daß die neugebildete RNA messenger-Eigenschaften besitzt und daß unter dem Einfluß vermehrt messenger-RNA gebildet wird.

Wirkung von Cortisol auf Leberkerne:

Die Wirkung von Cortisol auf den RNA-Stoffwechsel von isolierten Leberkernen haben Dukes und Sekeris untersucht ⁽²⁸⁾. Sie konnten zeigen, daß Zugabe von Cortisol zu isolierten Leberkernen binnen zwei Stunden zu einer erhöhten Markierung der RNA führt. Durch einstündige Vorinkubation der Kerne mit ¹⁴C-Uracil konnte ein Hormoneffekt schon nach einer Stunde nachgewiesen werden.

Wir versuchten nun zu zeigen, daß die neugebildete RNA auch messenger-Aktivität besitzt, und daß mit Cortisol inkubierte Leberkerne mehr messenger-Aktivität besitzen. Die RNA haben wir nach der von Georgiev und Mantieva angegebenen Methode fraktioniert bei 4° C, 50° C und 65° C isoliert. Bei 4° C soll nur ribosomale RNA, bei 50° C Vorstufen der ribosomalen RNA extrahiert werden. Beide Fraktionen haben eine Basenzusammensetzung wie RNA, die von cytoplasmatischen Ribosomen isoliert werden kann. Erst die Extraktion bei 65° C ergibt eine RNA, die eine der DNA entsprechende Zusammensetzung hat. Beide RNA-Fraktionen steigern die Proteinsynthese, aber die 65° C - Fraktion hat die größte Matrizenaktivität.

Tabelle 5

Einfluß von Cortisol auf die Template-Aktivität der 4° C - Fraktion

Zugabe von Kern-RNA	Vorbehandlung der Kerne	¹⁴ C-Leucin-Einbau Ipm/mg ribo- somaler RNA, 40 min Inkubation
keine		636 ± 26
20 µg		841 ± 23
20 µg	mit 15 µg Cor- tisol 15 min inkubiert	781 ± 28
20 µg	mit 50 µg Cor- tisol 15 min inkubiert	803 ± 31

Tabelle 6

Einfluß von Cortisol auf die Template-Aktivität der 65° C -
Fraktion

Zugabe von Kern-RNA	Vorbehandlung der Kerne	¹⁴ C-Leucin-Einbau Ipm/mg ribo- somaler RNA, 40 min Inkubation		
keine		545 ± 10		
10 µg		1070 ± 17		
10 µg	mit 15 µg Cor- tisol 15 min inkubiert	1322 ± 33	p	0,01
10 µg	mit 50 µg Cor- tisol 15 min inkubiert	1413 ± 38	p	0,01

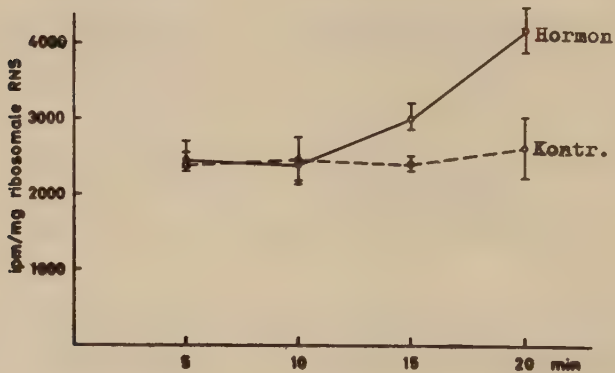
Tabelle 7

Einfluß von Cortisol auf die Template-Aktivität der 50° C - und 65° C - Fraktionen

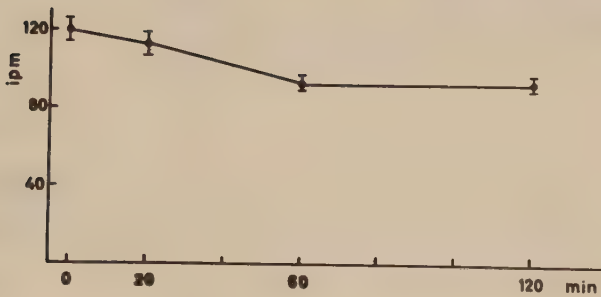
Zugabe von Kern-RNA	Vorbehandlung der Kerne	¹⁴ C-Leucin-Einbau Ipm/mg ribo- somaler RNA, 40 min Inkubation
keine		644 ± 46
40 µg	50° C - Fraktion	1436 ± 120
40 µg	50° C - Fraktion mit 25 µg Corti- sol 15 min inku- biert	1506 ± 72
7 µg	65° C - Fraktion	1808 ± 131
7 µg	65° C - Fraktion mit 25 µg Corti- sol 15 min inku- biert	2941 ± 69 p 0,005

Wie man aus der obigen Tabelle sieht, haben alle RNA-Fraktionen Template-Aktivität, am größten ist diese Aktivität in der 65° C - Fraktion. Ein Hormoneinfluß läßt sich nur in dieser Fraktion nachweisen, die ribosomalen Fraktionen reagieren nicht. Dieser Befund scheint uns für die Erklärung des Wirkungsmechanismus von besonderer Bedeutung zu sein, denn in allen bisherigen Experimenten fand man immer nur eine Steigerung der Gesamt-RNA-Synthese. Nach diesem Befund scheint diese Steigerung der Gesamt-RNA-Synthese möglicherweise ein Sekundäreffekt zu sein, eine unspezifische Mitreaktion.

Die größte Steigerung der Matrizenaktivität läßt sich nach 15 bis 20 min Inkubation der Kerne mit dem Hormon nachweisen; 15 min Inkubationsdauer wurde deshalb in folgenden Versuchen als Standardzeit gewählt. Die nächste Abbildung zeigt den Einfluß der Inkubationszeit der Kerne mit dem Hormon auf die Matrizenaktivität der RNA. In einigen Versuchen war ein geringer Hormoneffekt schon nach 10 min nachweisbar.



Die Inkubation der Kerne allein hat einen hemmenden Einfluß auf die Matrizenaktivität der Kern-RNA, wie die nächste Abbildung zeigt. Eine Erklärung für dieses Phänomen haben wir nicht, ein Abbau der RNA, gemessen an der UV-Absorption, läßt sich nicht nachweisen.



Der Abfall der Template-Aktivität bei den Kontrollen ist in allen Versuchen sichtbar, allerdings verschieden stark; ebenso ist die durch das Cortisol hervorgerufene Steigerung verschieden groß.

Der Anstieg der Matrizenaktivität der mit Cortisol inkubierten Kerne setzt bei Kernen, die von Normaltieren oder von adrenalectomierten Tieren gewonnen wurden, zur gleichen Zeit ein; es hat aber den Anschein, als seien Kerne von adrenalectomierten Tieren empfindlicher gegenüber Cortisol. Hohe Steroiddosen wirken in beiden Fällen hemmend auf die Matrizenaktivität. Die folgende Tabelle gibt einen solchen Versuch wieder.

Tabelle 8

Einfluß verschiedener Cortisoldosen auf die Template-Aktivität der RNA von Normalratten und adrenalectomierten Tieren (Inkubationsdauer 20 min, 20 µg 65° C - RNA)

Normaltiere		Adrenalectomierte Tiere	
Dosis µg	Ipm/mg ribosomale RNA		
Kontrolle	491 ± 16	712 ± 7	1512 ± 66
0,1			2567 ± 222 p < 0,05
1,0	533 ± 20	1042 ± 20 p < 0,005	2247 ± 109 p < 0,005
5,0	550 ± 11 p < 0,05	1036 ± 135 p < 0,05	2196 ± 81 p < 0,001
10,0			
25,0			2164 ± 102 p < 0,05
50,0	686 ± 7 p < 0,005	707 ± 57	1855 ± 388

Die nächste Tabelle zeigt den Einfluß verschiedener Steroide auf die Matrizenaktivität der RNA. Die Inkubationszeit der Kerne mit den verschiedenen Steroiden war 15 min, die Extraktionstemperatur 65° C. Um die verschiedenen Versuche vergleichen zu können, wurden die Kontrollen jeweils gleich 100 gesetzt.

Tabelle 9

Steroid	Zugesetzte Menge (in µg)	Proteinsynthese in vitro (Eingebautes ¹⁴ C-Leucin)
Kontrolle	-	100
Cortisol	50	204
Testosteron	50	109
Androstandion	10	100
Androstandion	50	54
Cortisol	50	160
Cortison	50	120
Pregnandiol	50	106
Cortisol	20	179
Progesteron	50	112
17α-Oxypro- gesteron	25	100

Man sieht, daß lediglich das Cortison eine geringe Steigerung der Matrizenaktivität hervorruft. Alle anderen Stoffe sind inaktiv.

Induktion der Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase:

Die Funktion der messenger-RNA ist ihre Fähigkeit, als Matrize für spezifische Proteine zu dienen. Die vorher geschilderten Versuche sollten zeigen, daß sich aus Zellkernen eine RNA isolieren läßt, die Matrizeneigenschaft besitzt, daß durch Inkubation der Kerne mit Hormon Matrizenaktivität gesteigert wird, und daß nur Hormon diese Steigerung hervorruft.

Wir konnten nun Hinweise dafür gewinnen, daß die unter Hormoneinfluß synthetisierte RNA fähig ist, eine erhöhte Synthese der Tyrosin-Transaminase zu bewirken.

Aus in vivo-Versuchen ist bekannt, daß Cortisol die Aktivität der Tyrosin-Transaminase in der Leber steigert und daß diese Aktivitätssteigerung durch Hemmung der RNA- und Proteinsynthese unterdrückbar ist ⁽¹⁵⁾. Man muß also annehmen, daß die Aktivitätssteigerung durch Proteinneusynthese hervorgerufen wird, und daß die Neusynthese durch Synthese von messenger-RNA gesteuert wird. In unserem Kernsystem haben wir eine Steigerung der Matrizenaktivität gefunden. Falls diese gesteigerte Matrizenaktivität spezifisch ist, sollte man eine gesteigerte Aktivität der Tyrosin-Transaminase in dem neugebildeten Proteingemisch finden.

Tatsächlich läßt sich in dem neugebildeten Proteingemisch Tyrosin-Transaminaseaktivität nachweisen. Unter dem Einfluß von RNA, die von mit Cortisol inkubierten Kernen stammt, nimmt diese Aktivität zu. Tabelle 10 gibt einige dieser Versuche wieder. Die Werte sind in %-Umwandlung (% Radioaktivität von Phenylbrenztraubensäure/Gesamtradioaktivität) angegeben. In einem Teil der Versuche war das zugesetzte Pyridoxalphosphat und -Ketoglutarat

nicht neutralisiert, das Enzym arbeitete also in saurem pH. Der prozentuale Unterschied zwischen Kontrolle und Hormonansatz bleibt aber der gleiche, wie Vergleichsuntersuchungen gezeigt haben.

Die Fehlerbreite der Bestimmung im sauren pH betrug 0,5 %, sonst 0,5-1 %.

Tabelle 10

Quelle der RNA	% Umwandlung	% Steigerung gegenüber Ribosomen ohne zugesetzte RNA	ASES (System ohne RNA-100)	
keine RNA	1,33	---	100	
Kontroll-RNA	2,22	53	145	Normaltiere
50 µg Cortisol	3,18	130	300	
50 µg Testosteron	2,21	52	160	
keine RNA	0,96	---	100	
Kontroll-RNA	0,91	-5	200	adrenalektomiert
1 µg Cortisol	1,09	14	205	
10 µg Cortisol	1,32	34	320	
keine RNA	24,0	---	100	adrenalektomiert
Kontrolle	24,4	10	155	
25 µg Cortisol	32,1	134	255	

Der Vergleich zwischen der Steigerung der Proteinsynthese und der Zunahme der Tyrosin-Transaminaseaktivität zeigt, daß zwar jede RNA die Proteinsynthese an den Ribosomen zu steigern vermag, daß aber nur RNA aus mit Cortisol inkubierten Kernen eine deutliche Steigerung der Enzymaktivität hervorruft. Die Steigerung der Enzymaktivität scheint also eine spezifische Hormonwirkung zu sein.

Nicht jede RNA enthält die Information zur Bildung der Tyrosin-Transaminaseaktivität. Nur Leberkern-RNA steigert die Enzymaktivität im ASES-Ansatz. Wieder zeigt sich, daß Steigerung der Proteinsynthese und der Enzymaktivität nicht parallel laufen.

Tabelle 11

Quelle der RNA	% Umwandlung	% Steigerung	ASES (System ohne RNA=100)
keine RNA	13,5	---	100
Leberkern-RNA	16,3	20	1208
Tabakmosaikvirus-RNA	12,3	-9	250
ribosomale RNA	12,9	-4	200

Zusammenfassend kann man sagen, daß das Cortisol sehr spezifisch innerhalb kurzer Zeit eine Steigerung der Matrizenaktivität der Leberzellkerne hervorruft, zu einem Zeitpunkt, zu dem noch keine Steigerung der Gesamt-RNA-Synthese nachweisbar ist. Kerne aus adrenaletomierten Tieren scheinen gegenüber dem Cor-

tisol empfindlicher zu sein als Kerne von Normaltieren. Außerdem liegen Hinweise dafür vor, daß unter Cortisol vermehrt der messenger für die Tyrosin-Transaminase gebildet wird.

Diskussion

Für die Beurteilung der ganzen Versuche ist die Reinheit der Kernpräparation von großer Bedeutung. Unsere Kernpräparationen waren mikroskopisch sehr sauber: Es fanden sich keine Mitochondrien, aber immer ein geringer basophiler Hintergrund, der wenigstens teilweise von geplatzten Kernen herstammte, wie manche Ausstrichpräparate zeigten. Geringe cytoplasmatische Verunreinigungen lassen sich auf diese Weise nicht ausschließen.

Siebert ⁽⁵⁴⁾ hat kürzlich eine Reihe von Kriterien für die Reinheit von Kernpräparationen angegeben. Er hat eine Reihe von Enzymen während der Reinigung gemessen und den RNA/DNA-Quotienten bestimmt. Während der Gehalt an Enzymen stark von den verwendeten Isolationsmedien abhängt, ist der RNA/DNA-Quotient weitgehend davon abhängig und somit ein gutes Maß für die Reinheit von Kernpräparationen. Gemessen an diesen Kriterien kann man unsere Präparationen als gut bezeichnen; die Bestimmung cytoplasmatischer und mikrosomaler Leitenzyme hat ergeben, daß unsere Kerne wenig verunreinigt waren.

Ein anderes Problem ist die Reproduzierbarkeit der Hormoneffekte. Obwohl das Verfahren der Kernpräparation soweit wie möglich standardisiert war und obwohl die Analysen erkennen ließen, daß die Reinheit der Präparation nur wenig schwankte, ließ sich das

Ausmaß des Hormoneffekts nicht reproduzieren, ja es gab, ohne daß die Bedingungen verändert wurden, Präparationen, die nicht auf Hormon ansprachen. Weder durch Änderung der eingreifendsten Präparationsschritte, der Homogenisation und der Inkubation mit Triton X-100, ließ sich eine bessere Reproduzierbarkeit erreichen. Das Alter der Tiere und, soweit erkennbar, die Reinheit der Kernpräparation hatten ebenfalls keinen Einfluß. Die RNA-Synthese war dabei aber nicht gestört, wie man bei Versuchen mit ^{14}C -Uracil ja gut erkennen konnte. Man kann also die geschilderten Befunde nur qualitativ interpretieren.

Betrachtet man mit diesen Einschränkungen unsere Ergebnisse, so zeigt sich, daß isolierte Zellkerne fähig sind, auf in vitro hinzugefügtes Hormon zu reagieren, daß sie in der Lage sind, RNA mit der vollen Information für ein Enzymprotein zu synthetisieren, und daß der Hormoneffekt sehr schnell eintritt und im Hinblick auf das Steroid spezifisch ist.

Vergleicht man die Wirkungen der drei untersuchten Hormone auf den RNA-Stoffwechsel, so zeigen sich bemerkenswerte Ähnlichkeiten. Alle drei Hormone führen in kurzer Zeit zu einer Intensivierung des RNA-Stoffwechsels des Zellkerns. Für das Ecdyson und das Cortisol konnte gezeigt werden, daß die neusynthetisierte RNA Matrizenaktivität besitzt, d.h. sie vermag die Proteinsynthese in einem in vitro-System zu steigern. Für das Progesteron steht dieser Beweis noch aus. Am Beispiel des Cortisols konnte auch gezeigt werden, daß dieser Einfluß sehr spezifisch ist und auch messenger-Aktivität besitzt, d.h. die RNA besitzt die Information für ein funktionsfähiges Protein.

Unsere Ergebnisse stehen im Einklang mit den Befunden anderer Autoren. So haben Sekeris, Lang und Karlson in in vivo-Versuchen gezeigt, daß durch Zufuhr von Ecdyson der Einbau von ^{32}P in die Kern-RNA gesteigert wird, und daß die aus hormonbehandelten Tieren isolierte RNA gegenüber der aus Kontrolltieren isolierten RNA eine erhöhte Matrizenaktivität besitzt (12). Darüber hinaus konnten Sekeris und Lang zeigen, daß nur RNA aus hormonbehandelten Tieren in der Lage ist, die Synthese eines Enzyms zu ermöglichen, das auch im Laufe der normalen Entwicklung unter dem Einfluß von Ecdyson gebildet wird, nämlich der DOPA-Decarboxylase (50).

Enzyminduktion durch Cortisol ist für eine Vielzahl von Enzymen beschrieben worden, ebenso die Hemmbarkeit der Enzyminduktion durch Inhibitoren der Protein- und RNA-Synthese, so auch für die von uns studierte Tyrosin-Ketoglutarat-Transaminase (15). Feigelson (16) und Kenney (19) beschrieben eine Steigerung der RNA-Synthese, darunter besonders der Kern-RNA, unter Cortisol. Sekeris und Lang konnten später nachweisen, daß die neugebildete RNA messenger-Eigenschaften besitzt (36).

Lutwak-Mann (36) und Pincus (3) haben einen Anstieg der Carboanhydraseaktivität unter Progesteron beobachtet, Lammes und Willighagen (33) einen Anstieg der 5-Nucleotidase-Aktivität gefunden. Der Einfluß von Progesteron auf den RNA-Stoffwechsel ist unseres Wissens weder in vivo noch in vitro studiert worden. Unsere Ergebnisse zeigen eine Erhöhung der Uracil-Incorporation, es ist deshalb wahrscheinlich, daß auch das Progesteron über die Steuerung der RNA-Synthese wirkt.

Die Karlson'sche Theorie fordert vor allem eine Steigerung einer spezifischen messenger-RNA. Wir fanden die stärkste Hormonwirkung in der 65° C - Fraktion, die nach den Untersuchungen anderer Autoren die messenger-Eigenschaften besitzt. Es wird aber unter Hormoneinfluß auch vermehrt ribosomale RNA synthetisiert. Bei den Versuchen mit isolierten Leberkerne läßt sich eine Steigerung der messenger-Aktivität schon zu einem Zeitpunkt nachweisen, zu dem noch keine hormonbedingte Steigerung der Gesamt-RNA, gemessen am Uracil-Einbau, einsetzt. Das spricht für die Annahme, daß der primäre Schritt bei der Enzyminduktion eine Neubildung einer spezifischen messenger-RNA ist, und daß die immer beobachtete Steigerung der Synthese der ribosomalen RNA ein Sekundäreffekt ist. Wie das Hormon die Neusynthese anregt, bleibt offen, es muß aber ein Vorgang sein, der verhältnismäßig schnell, innerhalb von Minuten abläuft und im Zellkern lokalisiert ist. Folgt man der Karlson'schen Theorie, so müßte noch vor der Steigerung der RNA-Synthese eine Steigerung der RNA-Polymerase, also des Enzyms, das die RNA-Synthese bewerkstelligt, nachweisbar sein. In der Tat haben Lang und Sekeris in vivo und neuerdings Lukács und Sekeris in vitro gezeigt, daß Cortisol in vivo und im isolierten Zellkern zu einer Steigerung der RNA-Polymerase-Aktivität führt, und daß diese Steigerung schon vor dem Einbau radioaktiver Vorstufen in die RNA bzw. vor dem Auftreten einer Steigerung der messenger-Aktivität auftritt. Die Natur dieses Vorgangs, der die eigentliche Primärwirkung des Hormons zu sein scheint, ist noch unbekannt. Er scheint aber komplexer Natur und hochorganisiert zu sein,

denn Bonner hat gezeigt, daß isoliertes Chromatin, das mit Hormon inkubiert wird, keine bessere Matrize für die RNA-Synthese ist als unbehandeltes, wohl aber Chromatin von hormon-behandelten Tieren (9).

Über den Mechanismus der Erhöhung der Polymerase-Aktivität gibt es mehrere Vorstellungen. Am plausibelsten ist, daß der RNA-Polymerase-Komplex normalerweise in inaktiver Form vorliegt, daß die Ablesung der DNA durch einen Repressor verhindert wird. Unter dem Einfluß des Hormons, eventuell durch einen allosterischen Effekt auf den Repressor, löst sich der Repressor von der DNA, und die RNA-Synthese kann beginnen. Eine andere Möglichkeit ist, einen allosterischen Effekt auf die Polymerase selbst anzunehmen, in diesem Fall wäre das Enzym in einer inaktiven Form. Wieder eine andere Möglichkeit wäre die Neubildung der Polymerase, dann erhebt sich die Frage nach einer Matrize für die Polymerase.

Die Karlson'sche Konzeption der Hormonwirkung über eine Beeinflussung der Genaktivität scheint durch unsere Untersuchungen eine gute Stütze erhalten zu haben. Es wurde gezeigt, daß der Angriffspunkt der untersuchten Hormone im Zellkern liegt, daß die Hormonwirkung ohne wesentlichen Einfluß des Cytoplasmas und/oder cytoplasmatischer Organellen zustande kommt, und daß die Steuerung der messenger-Synthese der wesentliche Schritt der ganzen Reaktionskette ist.

Zusammenfassung

Es werden Versuche über den Einfluß verschiedener Hormone auf den RNA-Stoffwechsel isolierter Zellkerne beschrieben. Im einzelnen wurden folgende Kern-Hormon-Systeme untersucht: Endometriumzellkerne des Schweins - Progesteron, Epidermiszellkerne - Ecdyson, Leberzellkerne der Ratte - Cortisol und einige andere Steroide. Dabei wurden folgende Ergebnisse gewonnen:

- 1). Progesteron ruft an Endometriumzellkernen aus der Proliferationsphase nach einstündiger Inkubation eine Steigerung der RNA-Synthese hervor, während Oestradiol ohne Wirkung ist. Es wird gezeigt, daß die Steigerung der RNA-Markierung mit radioaktiven Vorstufen auf einer Steigerung der RNA-Neusynthese beruht.
- 2). Ecdyson, das Verpuppungshormon der Insekten, bewirkt an Epidermiszellkernen nach 15 min Inkubation eine Steigerung der RNA-Synthese. Bei derselben Inkubationsdauer läßt sich eine deutliche Steigerung der Matrizenaktivität unter dem Hormoneinfluß demonstrieren.
- 3). Cortisol steigert die Matrizenaktivität der Leberkern-RNA nach 15 min Inkubation, zu einem Zeitpunkt, an dem eine Steigerung der Gesamt-RNA-Synthese noch nicht nachweisbar ist. Die Steigerung der Matrizenaktivität erfolgt allein in der 65° C - Fraktion der RNA, der Fraktion, die auch nach anderen Kriterien messenger-Aktivität besitzt. Andere Steroide außer dem Cortison sind inaktiv. Außerdem wird gezeigt, daß unter Cortisol vermehrt der messenger für die Tyrosin- α -Ketoglutarat-Transaminase synthetisiert wird.

Diese Ergebnisse werden im Zusammenhang mit der von Karlson aufgestellten Theorie vom Wirkungsmechanismus der Hormone diskutiert.

Herrn Professor Karlson danke ich für die großzügige Freiheit bei der Themenwahl und sein stetes Interesse, Herrn Dr. Seckeris für die Einarbeitung und Förderung, Herrn Dr. Dukes und Herrn Dr. Gallwitz für die gute Zusammenarbeit und die vielen Diskussionen. Für die technische Mithilfe bin ich Fräulein Nube und Fräulein Hellmann zu Dank verpflichtet.

Literaturverzeichnis

1. K. Ahren, L. Rubinstein, Acta Physiol. Scand. 69, 463 (1965)
2. O. Barnabel et al., Arch. of Biochem. Biophys. 109, 186 (1965)
3. G. Bialy, G. Pincus, Endocrinology 67, 728 (1960)
4. N.M. Blackburn, J.L. Kostyo, BBA 107, 168 (1965)
5. H. Breuer, In Mechanismus of Hormon Action, P. Karlson ed.
Georg Thieme-Verlag 6 (1965)
6. T.R. Castles et al., Proc. of Soc. for exptl. Biol. and
Med. 119, 108 (1965)
7. G. Ceriotti, J. Biol. Chem. 199, 297 (1957)
8. U. Clever, P. Karlson, J. Exptl. Cell Res. 20, 623 (1960)
9. M.E. Dahmus, J. Bonner, Proc. N. A. Sc. 54, 1370 (1965)
10. W. Dirscherl, Coll. Ges. Physiol. Chem. 5, 162 (1955)
11. P.P. Dukes, C.E. Sekeris, Z. Physiol. Chem. Hoppe-Sey-
ler 341, 149 (1965)
12. J.S. Edelman et al., Proc. N. A. Sc. 50, 1169 (1964)
13. M. Feigelson et al., BBA 55, 495 (1962)
14. P. Feigelson, O. Greengard, J. Biol. Chem. 237, 3714 (1962)
15. L.D. Garren et al., Proc. N. A. Sc. 53, 1443 (1965)
16. G.P. Georgiev, V.L. Mantieva, BBA 61, 153 (1962)
17. E. Goldwasser et al., BBA 103, 319 ff., 325 ff. (1965)
18. J. Gorski, N.J. Nelson, Arch. Biochem. Biophys. 110, 284,
(1965)
19. T. Hamilton, Proc. N. A. Sc. 49, 373 (1963); 51, 83 (1964)
20. O. Hechter, Vitamines and Hormones 13, 293 (1955)
- 20a. O. Hechter, Recent Progr. Horm. Res. 16, 139 (1960)
- 20b. O. Hechter, In Mechanismus of Hormon Action, P. Karlson ed.
Georg Thieme-Verlag 61 (1965)

21. H. Hilz et al., Biochem. Biophys. Res. Comm. 10, 492 (1963)
22. F. Jacob, J. Monod, J. Mol. Biol. 3, 318 (1961)
23. P. Karlson, DMW 86, 668 (1961)
- 23a. P. Karlson, Persp. Biol. Med. 6, 203 (1963)
- 23b. P. Karlson, C.E. Sekeris, Acta endocrin. 53, 505 (1966)
24. P. Karlson, C.E. Sekeris, BBA 63, 489 (1962)
25. P. Karlson, G. Peters, J. Gen. Comp. Endocrin. 5, 252 (1965)
26. F.T. Kenney, R.M. Flora, J. Biol. Chem. 236, 2699 (1961)
27. F.T. Kenney, F.J. Kull, Proc. N. A. Sc. 50, 493 (1963)
28. W.E. Knox, Brit. J. exptl. Path. 32, 462 (1951)
29. C.D. Kochakian, D.G. Harrison, Endocrinology 70, 99 (1962)
- 29a. C.D. Kochakian, Acta Endocrinol. Suppl. 92 (1964)
30. A. Korner, Biochem. Biophys. Res. Comm. 13, 386 (1963)
31. N. Lang, C.E. Sekeris, Life Science 3, 391 (1964)
32. S. Liao, H.G. Williams-Ashman, Proc. N. A. Sc. 48, 1956 (1962)
33. F.B. Lammes, R.G. Willighagen, Nature 198, 394 (1963)
34. O.H. Lowry et al., J. Biol. Chem. 193, 394 (1963)
35. Lutwak-Mann, J. Endocrin. 13, 26 (1955)
36. L.L. Miller, Rec. Progr. Horm. Res. 17, 539 (1961)
37. J. Monod, J.P. Changeux, F. Jacob, J. Mol. Biol. 6, 306 (1963)
38. G.C. Mueller, In Mechanismus of Hormon Action, P. Karlson ed. Georg Thieme-Verlag 228 (1965)
39. M. Ogur, G. Rosen, Arch. Biochem. Biophys. 25, 262 (1949)
40. M.A. O'Neal, A.C. Griffin, Cancer Res. 23, 618 (1963)
41. A.E. Pegg, A. Korner, Nature 205, 904 (1965)

42. G. Pelling, *Nature* 184, 655 (1959)
43. G.A. Porter et al., *Proc. N. A. Sc.* 52, 1326 (1964)
44. M. Ramuz et al., *Life Science* 4, 1967 (1965)
45. H. Rasmussen, *Am. J. Med.* 30, 112 (1961)
- 45a. H. Rasmussen, In *Mechanismus of Hormon Action*, P. Karlson ed.
Georg Thieme-Verlag 130 (1965)
46. I.L. Schwartz, H. Rasmussen, *Proc. N. A. Sc.* 46, 1288 (1960)
47. I.L. Schwartz, In *Mechanismus of Hormon Action*, P. Karlson ed.
Georg Thieme-Verlag 121 (1965)
48. H.L. Segal, Y.S. Kim, *Proc. N. A. Sc.* 50, 912 (1963)
49. H.L. Segal et al., *Proc. N. A. Sc.* 54, 782 (1965)
50. C.E. Sekeris, N. Lang, *Life Science* 3, 625 (1964)
51. C.E. Sekeris, N. Lang, *Life Science* 3, 169 (1964);
Z. Physiol. Chem. Hoppe-Seyler 339, 238 (1964)
52. C.E. Sekeris, N. Lang, P. Karlson, *Z. Physiol. Chem.*
Hoppe-Seyler 341, 36 (1965)
53. C.E. Sekeris, P. Karlson, nicht publiziert
54. G. Siebert et al., *Z. Physiol. Chem. Hoppe-Seyler* 340,
51 (1965)
55. M. Staehelin, *Experientia* 21, 229 (1965)
56. I.R. Tata et al., *Nature* 193, 1058 (1962);
I.R. Tata, C.C. Widnell, *BJ* 98, 604 (1966)
57. G.M. Tomkins, K.L. Yelding, *Cold Spring Harbour Symp.*
quant. Biol. 16, 331 (1961)
58. Hiroshi Ui, G.C. Mueller, *Proc. N. A. Sc.* 50, 256 (1963)
59. I.G. Wool, In *Mechanismus of Hormon Action*, P. Karlson ed.
Georg Thieme-Verlag 98 (1965)

Lebenslauf

Ich, Fritz Wolfgang Schmid, wurde am 30. Juli 1940 als Sohn des damaligen Dozenten für Pharmakologie Walter Schmid und seiner Ehefrau Edith in Tübingen geboren. Bis zum Abitur, das ich am humanistischen Uhland-Gymnasium in Tübingen ablegte, blieb ich in Tübingen. Dann folgte ich meinen Eltern, die inzwischen nach Marburg verzogen waren, und begann dort das Studium der Medizin. In Marburg studierte ich bis zum Physikum, ging dann ein Semester nach Wien, kehrte für zwei Semester nach Marburg zurück und studierte die drei letzten klinischen Semester in Freiburg. Dort legte ich nach dem Sommersemester 1964 das medizinische Staatsexamen ab. Am 1. Dezember 1964 begann ich am Physiologisch-Chemischen Institut bei Professor Karlson eine Doktorarbeit, die Experimente wurden im April 1966 abgeschlossen. Anschließend verbrachte ich den Pflichtteil der Medizinalassistentenzeit für Innere Medizin und Chirurgie am Städtischen Krankenhaus in Baden-Baden und bin jetzt als Medizinalassistent an der Universitäts-Frauenklinik in Marburg tätig.

Meine akademischen Lehrer während des Studiums waren
in Marburg in den vorklinischen Semestern: Niessing, Petry, Seidel, Hensel, Bücher, Walcher, Dimroth,
in Wien: Fellingner, Kunz, Hoff, Chiari, Brücke, Frankl,
in Marburg: Gedigk, Bock, Schmid, Schölmerich, Schwaiger, Huber, Siegert, Berendes, Du Mesnil de Rochemont, Linneweh,
in Freiburg: Könn, Noltenius, Heilmeyer, Krauß, Wimhöfer, Weyrich, Sarre, Haas, Creutzfeld, Künzer, Ruffin, Wegner, Zöllner, Kalkoff.

